

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

LICENCIATURA EN PROMOCIÓN DE LA SALUD

**El estudio de EGCG un metabolito activo del té verde como alternativa
para el tratamiento del cáncer de pulmón y algunas propuestas desde el
punto de vista de la promoción de la salud**

TRABAJO RECEPCIONAL

PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIADO EN

PROMOCIÓN DE LA SALUD

Presenta

ABRAHAN ISAAC GONZÁLEZ PÉREZ

Director de trabajo recepcional

Dr. Mario Cesar López Camarillo

México, D.F. julio 2015.

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

Director de Tesis

Dr. Mario César López Camarillo

Profesor Investigador: Laboratorio de Oncogenómica y Proteómica del Cáncer.

Posgrado de Ciencias Genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Asesores

Lic. Luis Alfonso León García

Academia de Matemáticas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Dr. José Alberto Mendoza Espinoza

Academia de Biología Humana

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Mtro. José Antonio García Segoviano

Academia de Biología Humana

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Mtro. Edgar del Carmen Sierra Palacios

Academia de Biología Humana

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

DEDICATORIA

A mis padres y Hermano

Porque son los que me han ayudado incondicionalmente, a lograr mis metas.

Agradezco a Dios por ser mi guía en cualquier momento que acudo a él, por darme la vida y por brindarme la oportunidad de estar con mis seres queridos y amigos.

Agradezco a mis padres, a mi mama Rosa Pérez Lugo y a mi papa Pedro González Ruiz, por apoyarme con mis estudios y por darme valores que me sirven de guía en todo momento.

A mi hermano Miqueas Jonathan González Pérez por darme el apoyo que he necesitado, es un gran apoyo siempre está ahí para ayudarme y brindarme unas palabras de aliento.

Agradezco a José Ali Flores Pérez Sánchez y Olga Noemí Hernández por su apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de tesis fue llevado en el laboratorio de Oncogénica y Proteómica del Cáncer del Posgrado de Ciencia Genómica, bajo la tutoría del Dr. Mario César López Camarillo el proyecto de investigación contó con el respaldo académico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México lo cual agradezco profundamente.

La tesis forma parte del proyecto financiado por la Secretaria de Ciencia, Tecnología e Innovación (SECITI) convenio 060/2013. “ANÁLISIS DE LOS EFECTOS DE LA INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA HDGF MODULADA EN RESPUESTA AL POLI FENOL EPIGALLOCATHECINA-3-GALLATO (EGCG) DEL TÉ VERDE EN CÉLULAS A549 DE CÁNCER DE PULMÓN”. (No. PI2011-60R). Agradezco la beca otorgada por el SECITI convenio 060/2013 para la realización del presente proyecto.

Agradecimiento a la UACM

Deseo mostrar mi agradecimiento a la Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM) por el apoyo económico que me ha otorgado para el empastado de este trabajo recepcional (Convenio número UACM-CSE-ITR/86/2015). Este apoyo ha sido un incentivo para llevar a buen término mi proyecto.

Lista de abreviaturas

aa	Aminoácidos
ADN	Acido desoxirribonucleico
CaPU	Cáncer de pulmón
CPCP	Cáncer de células pequeñas
CPCNP	Cáncer de células no pequeñas
HDGF	Factor de Crecimiento derivado de hepatoma
EGCG	Epigatocateina-3-galato
g	Gramo
h	Hora
min	Minuto
ON	Toda la noche
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Amortiguador fosfato salino
pH	Potencial de hidrogeno
SDS	Dodecil sulfato de sodio
μM	Micromoles

Resumen

El cáncer es una de las enfermedades con mayor índice de morbilidad en el mundo debido a que no existe aún una cura o prevención efectiva que pueda disminuir los altos niveles de mortalidad. El té verde es la infusión de hojas de la planta *Camellia sinensis*. Los constituyentes biológicamente activos del té verde han demostrado tener actividad terapéutica y preventiva contra el cáncer. Los experimentos en líneas celulares tumorales muestran que los polifenoles del té verde inducen arresto del ciclo celular y apoptosis en células tumorales, pero no en las células normales, lo cual favorece la disminución del crecimiento tumoral y la eliminación de las células cancerosas. En un proyecto anterior “Búsqueda de biomarcadores de quimioprevención mediante la identificación de proteínas moduladas en respuesta al tratamiento con el compuesto natural EGCG en células tumorales de cáncer de mama y pulmón” se identificó un panel de proteínas que se modulan en respuesta al tratamiento con el polifenol EGCG en células tumorales de cáncer de pulmón. Las proteínas que identificamos reprimidas y que han sido descritas en la literatura científica como importantes en el desarrollo y progresión del cáncer de pulmón incluyen a la proteína 29 de retículo endoplásmico, la Enoil CoA hidratasa, el Factor de crecimiento derivado de hepatoma, superóxido dismutasa y la UMPKMP cinasa. En este proyecto, validamos la disminución de la expresión del factor de crecimiento derivado de hepatocitos (HDGF) en respuesta al tratamiento con EGCG en la línea celular A549 de cáncer de pulmón mediante ensayos de Western blot. Posteriormente se inhibió la expresión del HDGF en las células A549 de cáncer de pulmón mediante

el uso de RNAs pequeños interferentes. Los resultados muestran que la inhibición del HDGF resultó en aumento de la muerte celular, inhibición de la migración de las células A549 de cáncer de pulmón. Además, la inhibición del HDGF y el tratamiento con EGCG resultó en aumento de la apoptosis y la necrosis de las células A549. Finalmente, se desarrollaron estrategias de Promoción de la Salud en relación a los efectos de EGCG presente en el Té verde.

ÍNDICE GENERAL

Página

Índice de figuras	10
1. Introducción	
1.1 Anatomía del pulmón	11
1.2 El Cáncer de pulmón	13
1.2.1 Incidencia de cáncer de pulmón en México	14
1.2.2 Factores de riesgo	15
1.2.3 Tratamiento	17
2. Antecedentes particulares	
2.1 Dieta y cáncer	17
2.2 Prevención del cáncer mediante el punto de vista empoderante	18
3. El té Verde	21
3.1 Composición del té verde	21
3.2 Efectos quimiopreventivos de la epigallocatequina-3-galato	23
4. Justificación	26
5. Objetivos	
5.1 Objetivo general	27
5.2 Objetivos específicos	27
6. Estrategia experimental	
6.1 Manejo de cultivos celulares de A549	28
6.2 Tratamiento de células A549 de cáncer de pulmón con el EGCG	29
6.3 Ensayo de viabilidad celular	29
6.4 Transfección	30

6.5 Extracción de proteínas totales de células A549	30
6.6 Ensayo de dosis letal 50	31
6.7 Western blot de factor de crecimiento derivado de hepatoma	31
6.8 Ensayo de apoptosis	32
6.9 wulden healing	32
7. Resultados	33
8. Conclusiones	50
9. Bibliografía	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía del aparato respiratorio

Figura 2. Incidencia y mortalidad

Figura 3. Las estructuras químicas

Figura 4. Mecanismos de acción del EGCG

Figura 5. Imágenes de la línea celular A549

Figura 6. Representación gráfica de la viabilidad de células A549 de cáncer de pulmón con diferentes tratamientos.

Figura 7. Gráfica de porcentaje de viabilidad

Figura 8. Gel SDS-PAGE al 10%

Figura 9. Gel de integridad SDS-PAGE al 10 %

Figura 10. Western blot de HDGF.

Figura 11. Análisis densitométrico de la expresión de HDGF

Figura 12. Micrografías que muestran la morfología de las células A549 después del tratamiento con EGCG y SHHDGF durante 48 horas.

Figura 13. Apoptosis y necrosis.

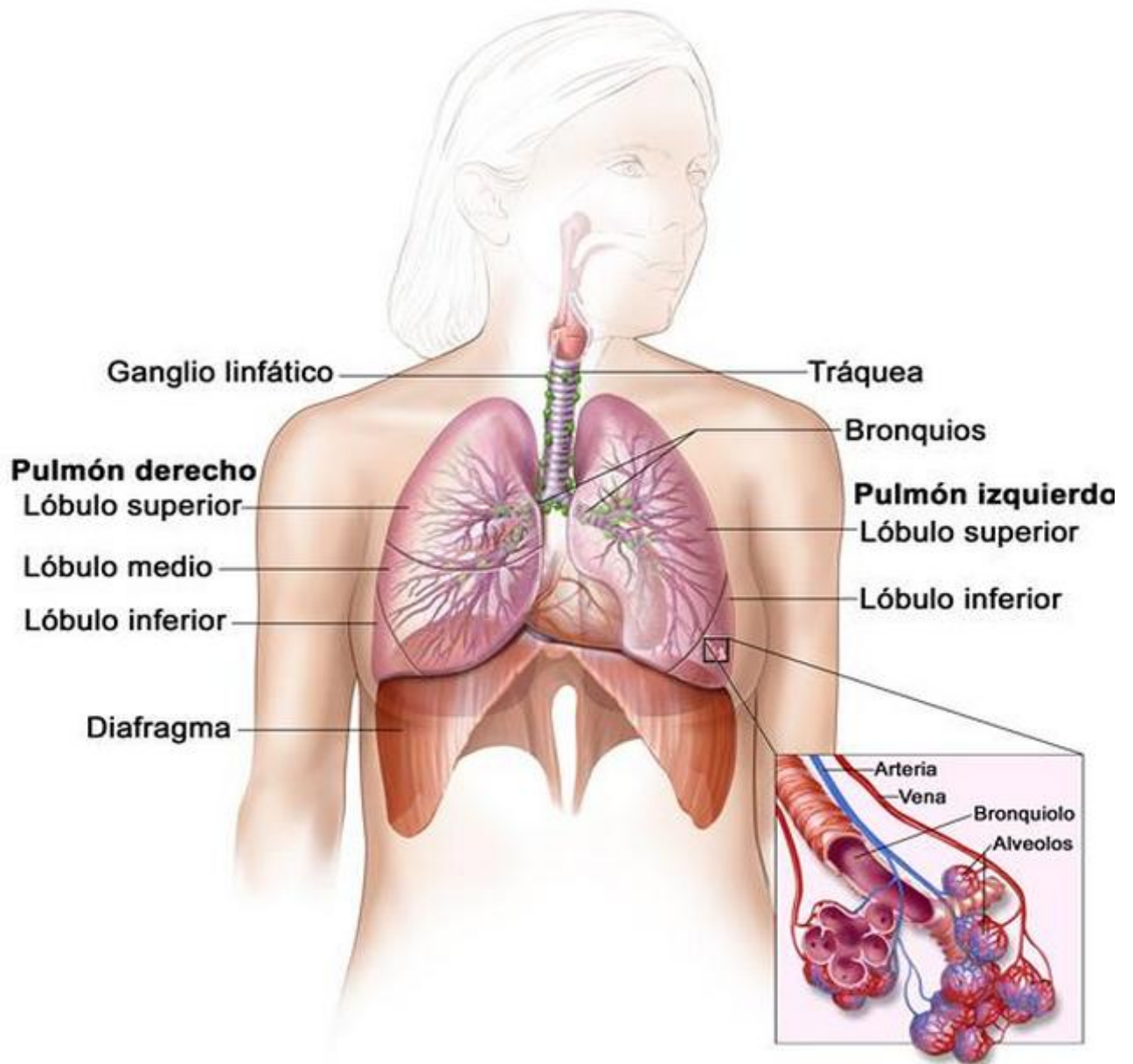
Figura 14. Tabla con los diferentes tratamientos que se realizaron en este ensayo

Figura 15. Ensayo para determinar migración.

1. Introducción

1.1 Anatomía del pulmón

Los pulmones (Figura 1) son órganos pares, de forma cónica, situados en la cavidad torácica. Están separados uno del otro y de otras estructuras del mediastino, que divide la cavidad torácica en dos compartimentos anatómicamente diferenciados, contienen dos membranas una pleural encierra y protege cada pulmón, la capa superficial tapiza la pared de la cavidad torácica y la pleura visceral reviste a los pulmones (Tortora y cols. 2002) los bronquios en el borde superior de la quinta vértebra torácica, la tráquea se divide en un bronquio primario derecho que va hacia el pulmón derecho y un bronquio primario izquierdo que va hacia el pulmón izquierdo, en la entrada de los pulmones los bronquios primarios se dividen para formar bronquios más pequeños uno para cada lóbulo del pulmón (el pulmón derecho tiene 3 lóbulos y el pulmón izquierdo tiene 2) los bronquios secundarios continúan ramificándose y dan lugar a bronquios más pequeños. Los alvéolos se encuentran en numerosos sacos y en una especie de celdilla con forma de copa recubierta por epitelio pavimentoso simple y sostenida por una membrana basal elástica fina, un saco alveolar consiste en más de un alveolo es aquí donde se realiza el intercambio gaseoso por lo que el sistema vascular se encarga de transportar la sangre desde los pulmones al organismo y viceversa (Tortora y cols., 2002).



© 2006 Terese Winslow
U.S. Govt. has certain rights

Figura 1. Anatomía del aparato respiratorio: En los pulmones se observan los lóbulos, bronquios, bronquiolos, alvéolos, vasos sanguíneos, venas y arterias. (INC, 2015).

1.2 El cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón se origina en las células epiteliales que revisten los bronquios y de los bronquiolos o los alvéolos. Los cambios genéticos causan el crecimiento descontrolado de las células y estas a su vez van adquiriendo modificaciones genéticas adicionales que contribuyen al proceso carcinogénico. Las células cancerosas inducen el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) mediante la secreción de varios factores de crecimiento los cuales inducen el crecimiento del tumor además de proveer nutrientes para continuar el crecimiento del tumor (INC, 2015). Los tipos de cáncer de pulmón más comunes son el carcinoma de células escamosas, carcinoma de células grandes y el adenocarcinoma, pero hay varios tipos adicionales que se presentan con menos frecuencia, y todos los tipos se presentan con variantes histológicas poco comunes. Aunque el cáncer de pulmón está relacionado al humo del cigarrillo, los adenocarcinomas se pueden presentar en pacientes que nunca han fumado (INC, 2015).

Los tumores son cancerosos y benignos. Las células de tumores benignos generalmente no son tan dañinas como las células de tumores malignos. Los tumores benignos de pulmón rara vez son una amenaza para la vida. Generalmente no necesitan ser extirpados no invaden los tejidos de su alrededor y no se diseminan a otras partes del cuerpo. Los tumores malignos de pulmón ponen la vida en peligro y pueden volver a crecer después de haber sido

extirpados además de invadir tejidos y órganos cercanos pueden diseminarse a otras partes del cuerpo.

Las células cancerosas se diseminan al desprenderse del tumor original, entran en los vasos sanguíneos o los ganglios linfáticos, los cuales se ramifican en todos los tejidos del cuerpo. Las células cancerosas se pegan a otros órganos y forman nuevos tumores que dañan esos órganos (INC, 2015)

1.2.1. Incidencia de cáncer de pulmón en México

El cáncer de pulmón es la principal causa de mortalidad por cáncer en los Estados Unidos. La tasa de supervivencia relativa a 5 años durante el período 1995–2001 para los pacientes de cáncer de pulmón fue de 15,7%. La tasa de supervivencia relativa a 5 años varía notablemente según el estadio en el momento del diagnóstico; es de 49 16 y 2% para los pacientes con enfermedad en estadio local, regional y a distancia respectivamente (INC, 2015). En México estos datos no son muy diferentes en relación de incidencia con los Estados Unidos. Algunos datos de incidencia lo colocan como el 5to. Lugar por debajo de los cánceres de mama, próstata, cervicouterino y colon (GloboCan, 2015)

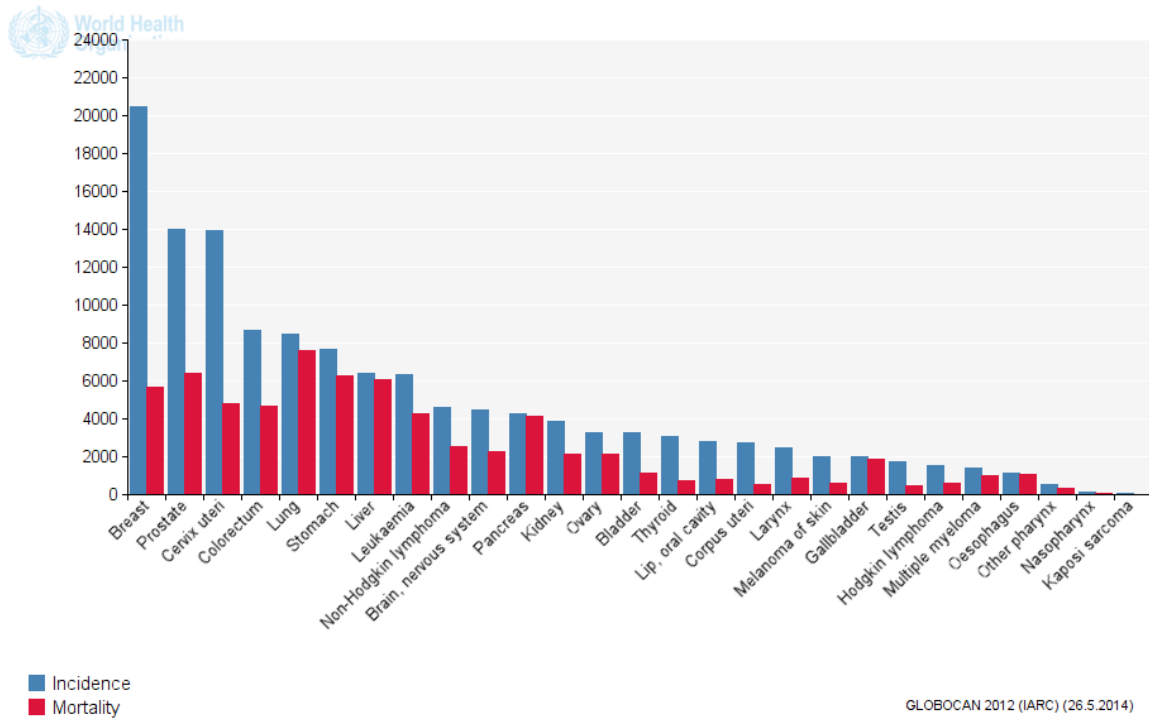


Figura 2. Incidencia y mortalidad por los principales tipos de cáncer en México. (GloboCan, 2015)

1.2.2 Factores de riesgo

Un factor de riesgo es un factor que puede aumentar la posibilidad de que una enfermedad se presente. Existen varios factores de riesgo que contribuyen a la formación de cáncer. Los grupos de investigación encuentran los siguientes factores de riesgo para cáncer de pulmón:

Humo de tabaco: Es sin duda el factor de riesgo más importante de cáncer de pulmón. Las sustancias nocivas del humo lesionan las células del pulmón, es por

eso que fumar cigarrillos, pipa o puros puede causar cáncer de pulmón y también la exposición al humo de tabaco puede causar cáncer de pulmón en personas que no fuman. Entre mayor sea la exposición al humo mayor es el riesgo de cáncer de pulmón.

Radón: El radón es un gas invisible sin olor y sin sabor. Se forma en la tierra y en las rocas. Las personas que trabajan en las minas pueden estar expuestas al radón. En algunas partes del país, el radón se encuentra en las casas. El radón daña las células del pulmón y las personas expuestas al radón tienen mayor riesgo de padecer cáncer de pulmón.

Asbesto y otras sustancias: Las personas que tienen ciertos trabajos (como quienes trabajan en las industrias de construcción y química) tienen un mayor riesgo de padecer cáncer de pulmón. La exposición al asbesto, arsénico, cromo, níquel, hollín, alquitrán y otras sustancias puede causar cáncer de pulmón. El riesgo es mayor para quienes tienen años de estar expuestos. El riesgo de cáncer de pulmón por exposición a estas sustancias es aún mayor en quienes fuman.

Contaminación del aire: La contaminación del aire puede aumentar levemente el riesgo de cáncer de pulmón. El riesgo por contaminación del aire es mayor para los fumadores. Antecedentes familiares de cáncer de pulmón: Las personas con padre, madre, hermano o hermana que tuvo cáncer de pulmón pueden tener un ligero aumento en el riesgo de esta enfermedad, aunque no fumen.

Antecedentes personales de cáncer de pulmón: Las personas que ya han tenido cáncer de pulmón tienen mayor riesgo de padecer un segundo tumor de pulmón.

(INC, 2015)

1.2.3 Tratamiento

El cáncer se puede tratar con quimioterapia, con terapia local (cirugía, radioterapia), o con una combinación de esos tratamientos. El tipo de tratamiento depende, por lo general, del tipo de cáncer que se tenga; del tamaño y ubicación del cáncer; así como de la edad y salud general del paciente; y de los tipos de tratamiento que el paciente ha recibido en el pasado (INC, 2015)

2. Antecedentes particulares

2.1 Dieta y cáncer

La nutrición es un proceso por el que el cuerpo incorpora los alimentos y los usa para crecer, mantenerse sano y reemplazar los tejidos. La buena nutrición es importante para la buena salud. El comer los alimentos apropiados antes, durante y después del tratamiento del cáncer puede ayudar al paciente a sentirse mejor y mantenerse fuerte. Una alimentación saludable incluye comer y beber una cantidad suficiente de alimentos y líquidos que contengan nutrientes importantes como son vitaminas, minerales, proteínas, carbohidratos, grasas y agua.

La terapia nutricional se usa para ayudar a los pacientes de cáncer a obtener los nutrientes que necesitan para mantener el peso corporal y la energía para mantener los tejidos del cuerpo sanos y defenderse con los ataques infecciosos y virales. Los hábitos de alimentación que son buenos para los pacientes de cáncer pueden ser muy diferentes de las pautas habituales de alimentación saludable.

Los hábitos de alimentación sana y la buena nutrición pueden ayudar a los pacientes a soportar los efectos del cáncer y su tratamiento. Algunos tratamientos para el cáncer funcionan mejor cuando el paciente está bien nutrido y obtiene suficientes calorías y proteína de los alimentos. Los pacientes que están bien nutridos pueden tener un mejor pronóstico (probabilidad de recuperación) y calidad de vida (INC, 2015)

2.2 Prevención del cáncer mediante el punto de vista empoderante

Para empezar debemos de definir que es un modelo emancipatorio, esta es la capacidad humana corporeizada para diseñar, decidir. y lograr futuros viables puede ayudar a identificar vínculos entre lo material y lo subjetivo inherentes al cuerpo individual y colectivo; a identificar los mecanismos para subordinar la salud a entender mejor los procesos de invasión del cuerpo-territorio, a identificar, entender la realidad, el deseo y la posibilidad; a buscar formas para desarrollar las capacidades humanas saludables; a abrir acceso a los recursos para así cambiar las inscripciones del poder en los cuerpos individuales y colectivos (OMS, 2014)

La labor de la promoción de la salud, consiste en darles a las personas la capacidad de decidir qué es lo que quiere y abarcar, para tener una mejor salud. Hay que tenerlo en cuenta lo individual y lo colectivo, pues no se puede aislar un problema sino que se debe de ver desde sus diferentes perspectivas, como los factores sociales, éticos, culturales, psicológicos, económicos. Los estereotipos entre otros, aíslan todo teniendo en cuenta que la salud se debe de ver más allá

de lo biológico podremos ver que el cáncer es un problema social muy importante pero ¿cómo desde esta perspectiva se puede prevenir?, y efectivamente desde este punto de vista se puede hacer mucho en la labor del promotor de la salud.

Para empezar, veremos cómo interpretan unos grupos de personas fuera del sitio de práctica como pudiera ser la percepción que tiene la gente de lo que es el cáncer y como está se relaciona con la familia, los amigos y cómo estos influyen en el ánimo de la persona enferma. La intención principal es que las personas y los grupos sociales se apropien del saber de los expertos y a partir de ahí modifiquen sus prácticas relativas a la salud y a la enfermedad. a la calidad de vida; esto es, que la familia de la persona con cáncer, investigue con los médicos que es el cáncer y como esta enfermedad se puede sobrellevar, si todos ponen de sus saberes y no simplemente se limitan a lo que diga el médico, sino al contrario, entiende y conoce mejor qué es esta enfermedad. Una vez que los expertos explican que es el cáncer y por qué ocurre, hay que relacionarlo con lo que se sabe y como esto repercutirá en la salud directa de la persona enferma y como esta puede salir adelante sobrellevándola, pues lamentablemente se desconoce mucho de esta enfermedad, así como que hacer en casos de emergencia. Aunado a lo anterior el costo de los medicamentos, hospitalización, dieta. Es aquí donde intervienen todos los actores sociales tanto médicos, familiares, las instituciones, la misma comunidad. Y con el fin de sobrellevarla a esta enfermedad difícil de curar, por lo que es mejor prevenirla esto se puede hacer a través de talleres, a la vez que el gobierno y la sociedad manden estrategias, y así mejorar la salud de una población cada vez más enferma. Por ello sabiendo todo esto, se puede decir

que es vital para la población mexicana que se prevenga el cáncer de pulmón fomentando el consumo del té verde, que como se menciona en este trabajo, esta planta es benéfica pues se ha demostrado que tiene efectos quimiopreventivos y quimioterapéuticos en diversos tipos de tumores de ahí la importancia de fomentar el consumo del té verde. Darles la opción a las personas de que ellas decidan, que se enteren que puede haber prevención de cualquier enfermedad. Y como se ha comentado aquí pueden participar tanto los profesionales de salud, de instituciones de gobierno.

También aplicando políticas en favor de la prevención, que hacer que la gente no llegue a una institución de salud cuando sea tarde, sino que tenga alternativa. Por eso resalto la prevención de consumir un té que tiene muchas propiedades terapéuticas.

Darle a la gente la oportunidad de relacionarse con un entorno saludable, lejos de enfermedades que limitan sus capacidades. El gasto en salud es importante pero si se diera a la promoción de la salud más dinero. La promoción de la salud en su vista de empoderamiento, intenta que las personas, plenamente informadas, decidan sobre sus procesos de salud enfermedad. Entonces podemos decir que efectivamente la promoción de la salud nos da herramientas metodológicas para prevenir enfermedades que son caras en su tratamiento y tienen un valor económico y social muy importante. Por lo cual desde este punto de vista de promoción de la salud se puede promover el uso del té verde como medida de prevención.

3. El té verde

El té verde (*Camellia sinensis*) sólo es superado por el agua en términos de popularidad en todo el mundo (Yang y cols. 2009). El té verde, que representa el 20% del consumo mundial, se caracteriza por la presencia de grandes cantidades de flavan-3-oles también conocidos como catequinas. Una taza típica de té verde preparado se hace usando 2g de hojas de té en 200ml de agua caliente y contiene aproximadamente 600-900mg de sólidos extraíbles en agua. De estos sólidos, aproximadamente el 30-40% en peso son las catequinas del té verde. De estos, el Epigallocatequina-3-galato (EGCG) es el más abundante de las catequinas y puede representar hasta el 50% de las catequinas en peso (Higdon y cols 2003).

3.1 Composición del té verde

Los componentes principales del té verde son las catequinas que contienen un esqueleto de benzopirano con un grupo fenilo sustituido en la posición 2 y una función hidroxilo (o éster) en la posición 3. Las variaciones en la estructura de catequina incluyen la estereoquímica de los sustituyentes 2,3 y el número de grupos hidroxilo en la B y D-anillo. Perteneciente a la clase flavan 3 de flavonoides, las catequinas más abundantes encontrados en las hojas de té incluyen (-) – epigallocatequina-3-galato [(-) – EGCG], (-) – epigallocatequina [(-) – EGC] , (-) – epicatequina-3-galato [(-) – ECG], (-) – epicatequina [(-) – CE], (-) –

catequina-3-galato [(-) – CG], y (-) – galocatequina-3-galato [(-) – GCG] (Yang y cols. 2009)

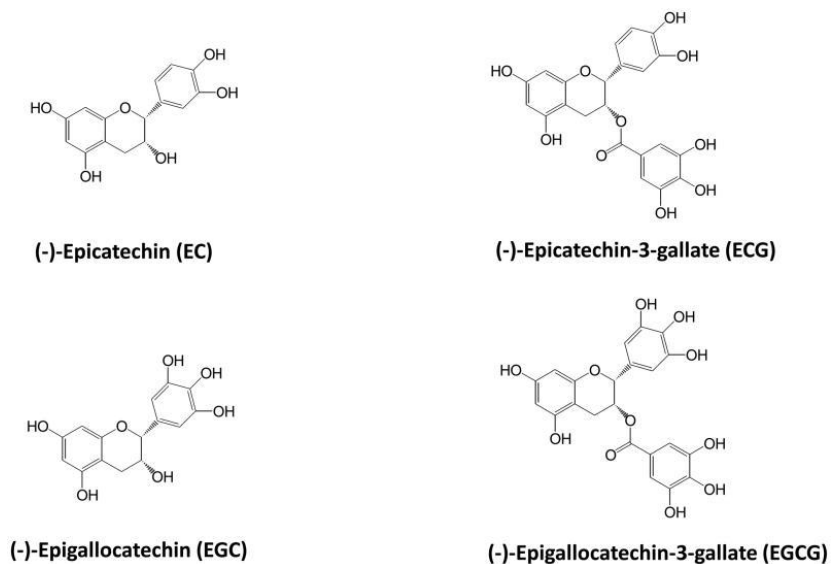


Figura 3. Las Estructuras químicas de los principales polifenoles del té verde.
(Yang y cols 2009)

3.2 Efectos Quimiopreventivos de la Epigallocatequina-3-Galato

Los efectos preventivos del cáncer por el EGCG son ampliamente apoyados por los análisis de epidemiológicos, estudios en animales. El EGCG es un compuesto antioxidante y se propone que este flavonoide suprime los procesos inflamatorios que conducen a la transformación, la hiperproliferación, e iniciación de la carcinogénesis (Thawonsuwan y cols. 2010). Los Polifenoles del té verde inhiben la proliferación celular y ejercen una fuerte actividad antirradical (Higdon y cols. 2003). Se ha demostrado que el EGCG es capaz de aumentar la actividad antioxidante en una variedad de órganos de ratón, mejorando el efecto global quimio-preventivo de los antioxidantes en las células y tejidos (Higdon y cols. 2003). El EGCG puede mejorar la comunicación que en ocasiones presentan diferencias entre las células y por lo tanto ayuda a proteger las células del desarrollo de tumores. Los estudios experimentales sugieren un efecto de este polifenol que puede bloquear la promoción del crecimiento del tumor mediante el bloqueo de los receptores en las células afectadas (Sigler y cols. 1993). Otro posible mecanismo indica que este compuesto puede facilitar la unión directa a ciertos carcinógenos (Sigler y cols. 1993). Sus influencias inhibitoras pueden en última instancia suprimir los pasos finales de la carcinogénesis, tales como la angiogénesis y la metástasis (Mukhtar y cols. 2000). Varios estudios en animales han puesto de manifiesto que el tratamiento con EGCG inhibe la incidencia de tumores y la multiplicidad en diferentes sitios de órganos tales como la piel (radiación UV e inducida químicamente), pulmón, hígado, mama, próstata, estómago y el colon basado en preclínica, observacional y datos de ensayos

clínicos. También bloquea la carcinogénesis mediante la modulación de las vías de transducción de señales involucradas en el desarrollo del cáncer (Ahmed y cols. 2004). Este flavonoide también afecta varias vías biológicas, incluyendo el factor de crecimiento mediada vía, la proteína activada por mitógeno (MAP) quinasa dependiente, y las rutas de ubiquitina / proteasoma degradación (Khan y cols. 2006). Recientemente, se han logrado enormes avances en el esclarecimiento de los mecanismos moleculares de la quimioprevención del cáncer ejercidos por el EGCG (Yang y cols. 2007). La supresión de diversos biomarcadores tumorales, incluyendo el factor de crecimiento de tirosina quinasas receptoras, los receptores de citoquinas cinasas, PI3K, fosfatasas, ras, raf, MAP quinasa, IKK, PKA, PKB, PKC, c-jun, c-fos, c-myc, cdks, ciclinas y proteínas de transducción relacionados por los polifenoles del té se han estudiado en nuestro laboratorio y otros. La actividad IKK en macrófagos murinos activados con LPS (células RAW 264.7) se encontró que se inhibió por EGCG (Singh y cols. 2010).

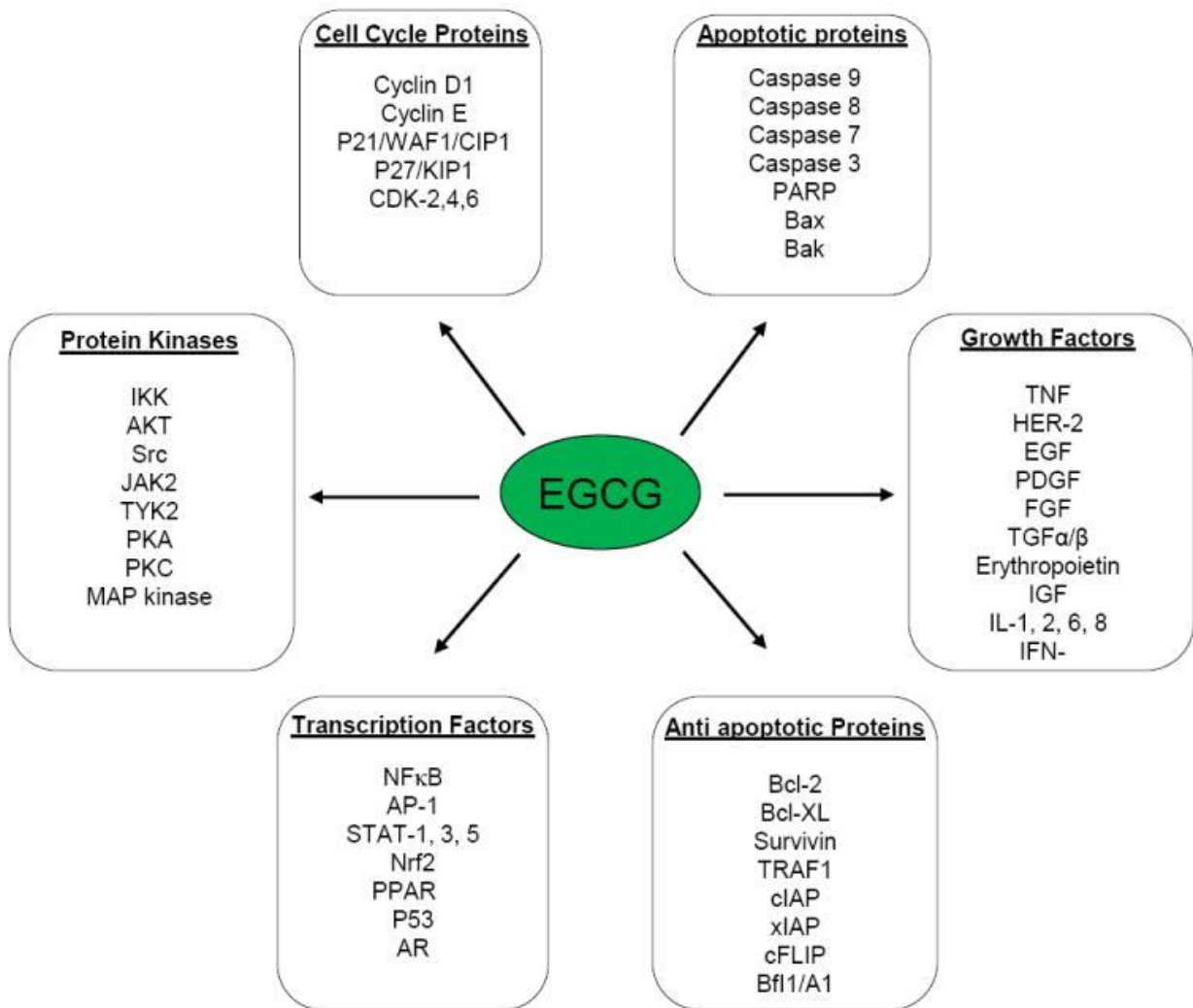


Figura 4. Mecanismo de acción del EGCG. Se Representa en el esquema, la inhibición de algunos receptores y vías de señalización importantes en cáncer.

4. Justificación

El cáncer de pulmón (CP) es la primera causa de muerte por cáncer a nivel mundial. El 80% de los pacientes son diagnosticados en etapas avanzadas y sólo el 13% sobreviven a 5 años. La carcinogénesis pulmonar es un proceso crónico que involucra el consumo al tabaco y la aparición de alteraciones genéticas que modifican genes que regulan el crecimiento, la diferenciación y la muerte celular, lo que finalmente lleva al desarrollo de cáncer invasivo o metastásico. En nuestro país el CP. Ocupa el primer lugar en mortalidad y es uno de los más agresivos del mundo. El CP. Tiene un pronóstico de sobrevida pobre por la baja efectividad de los tratamientos asociada al desarrollo de resistencia tumoral intrínseca y adquirida que se manifiesta por progresión temprana y respuestas transitorias. La quimio prevención es indispensable debido a que puede disminuir grandemente el riesgo de adquirir cáncer.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general:

Análisis de los efectos de la inhibición de la expresión de la proteína HDGF modulada en respuesta al el polifenol (-) - Epigallocatequina-3-galato (EGCG) del té verde en células A549 de cáncer de pulmón.

5.2 Objetivos particulares

1. Validar la expresión del factor de crecimiento derivado de hepatocitos (HDGF) en respuesta al tratamiento con EGCG en la línea celular A549 de cáncer de pulmón.
2. Inhibir la expresión del HDGF en las células A549 de cáncer de pulmón mediante el uso de RNAs pequeños interferentes.
3. Analizar el efecto de la inhibición de la expresión de HDGF en el crecimiento, proliferación, migración e invasión de las células A549 de cáncer de pulmón.

6. Estrategia experimental

6.1 Manejo de cultivos celulares de A549

Se utilizó la línea celular de humano A549 (adenocarcinoma alveolar). Estas células son adherentes, se caracterizan por ser de origen epitelial. El manejo de la línea celular se realizó en condiciones de esterilidad en campana de extracción, utilizando material y soluciones estériles. Las células se cultivaron en cajas de 75cm² (Corning CellBING) se adicionaron 5 ml de medio de cultivo (DMEM glutamax) complementado con suero fetal bovino al 10% en combinación con penicilina con el fin de prevenir contaminación bacteriana en el cultivo celular. Se incubaron en un medio a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂ y con un 95% de aire. Cuando se alcanzó una confluencia de un 90%, se realizaron varios pases para mantener la línea celular, para ello se retiró el medio de la caja, se realizó 1 lavado con 2 ml de PBS 1X pH 7.0 estéril, se adicionó 1.5 ml de PBS-EDTA pH 7.0 con 64µl de tripsina, mezclarse con movimientos suaves e incubar a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂ y con un 95% de oxígeno durante 5 min, despegar las células con movimientos oscilatorios y dando unos golpes suaves a la caja. Finalmente para inactivar la tripsina se adicionó 1 ml de medio DMEM una vez hecho esto se recolectó la fracción líquida en un tubo falcón de 15 ml se centrifugó a 1,500.00 rpm durante 5 min a 4°C, se desechó el sobrenadante y la pastilla celular se re-suspendió en 1 ml de medio de cultivo a temperatura ambiente.

6.2 Tratamiento de células A549 de cáncer de pulmón con el EGCG

El compuesto epigallocatequina-3-galato (EGCG) se obtuvo de SIGMA-ALDRICH (E4143). 2.5×10^6 células se cultivaron por triplicado en una placa de 6 pozos incubando por 24h en un ambiente a 37 °C en una atmosfera de 5% de CO₂ y con un 95% de oxígeno. Posteriormente el poli fenol EGCG se disolvió en agua inyectable y estéril con una concentración de 50mM en cada pozo de la placa, seguido de una incubación de 24h y 48h.

6.3 Ensayo de viabilidad celular

Una vez obteniendo el botón celular se adicionaron 1ml de medio de cultivo y se procedió a contar mediante un contador automatizado TC10 (Bio-Rad). Se obtuvo el número de células viables, se tomaron 10µl de la mezcla y se depositó en una laminilla de conteo, de esta manera se obtuvo el número total de células vivas. Por duplicado. Se pusieron 50,000.00 células por pozo en una placa de 24. Con las siguientes concentraciones de Cisplatino 1mM, 20, 40, 60, 80, 100, 120 mM con 500µl de DMEM sin complementar durante 24h. Pasando este tiempo se retiró el medio DMEM sin complementar se lavó con PBS 1X pH 7.0 y se agregó la solución Stock (5mg de MTT en 10 ml de DMEM sin complementar) 500µl por pozo durante 3h en un ambiente a 37 °C en una atmosfera de 5% de CO₂ y con un 95% de oxígeno. Después se adiciono el solvente MTT (10 µl de NP-40; 9.9 ml de Isopropanol) 200µl por pozo durante 15 min en el Shaker a 4°C.

6.4 Transfección es permitir la introducción de plásmidos al interior de las células en este caso fue a la línea celular A549

En un tubo eppendorf se adicionan 7µl de lipofectamine 2000 con 50µl de optimen a la par en otro tubo eppendorf se adicionaron 5µg de plásmido con 50µl de optimen se mezclaron durante 5 min pasando ese tiempo se adiciono a la placa de 6 pozos por pozo, durante 20 min a temperatura ambiente con medio DMEM sin complementar pasando ese tiempo se incubo durante 3h y se retiró el medio y se le adicionaron 2 ml de DMEM complementado.

6.5 Extracción de proteínas totales de células A549

Primero se sembraron células A549 hasta alcanzar una confluencia del 90% después estas células fueron despegadas con tripsina se mezclaron con el amortiguador TNTE para lisar las células, así obtener los extractos proteicos de las células tanto tratadas como no tratadas. Los extractos proteicos se cuantificaron por ensayo de Bradford para así tener la misma concentración de proteínas. Para llegar a obtener el número de proteínas totales de células tratadas y sin tratar (control) los cultivos se tripsinizaron y el botón celular se re suspendió en 252µl de amortiguador TNTE (Tris-HCL; 50mM pH 7.4; NaCl 150mM, triton X-1000, al 5%, EDTA 5mM) enfriado con el objetivo de lisar las células además de utilizar 18µl de Inhibidor de proteasas (IP). Se colocó en un tubo en agitación vigorosa y constante a 4°C durante 15 min. Una vez re suspendido el botón celular se procedió a colocar en un tubo de 1.5 ml y se centrifugo a 12,000.00 rpm 10 min a 4° C se recuperó el sobrenadante y se almacenan los extractos proteicos a -30°C.

Para determinar la viabilidad celular se realizó un ensayo de dosis letal 50 con la finalidad de ver cuál es la concentración mínima necesaria para mantener el 50% de las células vivas

6.6 Ensayo de dosis letal 50.

Para este paso se sembraron las células en placas de 6 pozos de cultivo bajo las siguientes concentraciones del té verde: 20mM, 40mM, 60mM, 80mM, 100mM, 120mM. A todos los pozos se les adicionaron 500 µl de medio DMEM sin complementar. Se procedió hacer el ensayo de MTT (reflejar el número de células viables presentes), Se preparó una solución (Stock), Disolviendo 5mg de MTT (tetrazolio XTT) en 10 ml de DMEM sin complementar se conserva a 4°C por 2 semanas, pasado ese tiempo se lavaron las células con PBS1X y se adiciono 500µl de (stock) durante 3h en incubación. Se retiró el Stock sin lavar las células, se adicionaron 200µl del solvente MTT por pozo, Se cubrió con papel aluminio la placa durante 15 min, Se evaluaron 2 pozos con el solvente como control

6.7 Western blot de factor de crecimiento derivado de hepatoma

Se prepararon geles SDS-PAGE al 12% a fin de llevar el corrimiento electroforético de 50µg de proteínas totales de A549 sin tratamiento y tratadas con la DL50 de EGCG determinada en 24 y 48h. Las muestras se cargaron con la ayuda de micropuntas. La electroforesis en una dimensión se realizó con un voltaje de 100 V hasta que se saliera del gel el frente de corrida. Posteriormente las proteínas se transfirieron a un membrana de nitrocelulosa, en una cámara semi húmeda con un voltaje de 25V durante 30 min. A continuación la membrana se

bloqueó con ml de PBS 1X con Tween 0.05% y con leche semidescremada al 5% ON/4°C. Finalmente se lavó 3 veces con PS 1X pH 7.0 durante 5 min. Se incubó ON/4°C con el anticuerpo primario HDGF (1:100) con PBS 1X pH7.0-Tween 0.05%. Al día siguiente se retiró el anticuerpo primario se lavó la membrana 3 lavados de 5 min con PBS 1X pH 7.0. y por último se incubó la membrana con el anticuerpo secundario anti-cabra (1:100) con PBS 1X pH 7.0-Tween al 0.05%. La unión del anticuerpo primario a la proteína se reveló mediante quimioluminiscencia y autoradiografía utilizando el reactivo ECL plus (GE Healthcare Life Sciences)

5.8 Ensayo de apoptosis

En la placa de 6 pozos se pusieron 250,000.00 células por pozo, se transfeció y se hizo tratamiento con TE EGCG durante 48h pasando ese tiempo se llevó a leer en un citómetro de flujo.

6.9 Wulden healing

Se sembraron células en placa de 6 pozos con un cubreobjetos se dejaron 24h pasando ese tiempo con una punta estéril se raya el cubreobjetos con líneas definidas que pasen por todo el cubreobjetos, se lavó con PBS 1X pH 7.0 se agitó se retiró y se sacaron fotografías.

7. Resultados

Detención de cambios morfológicos en células A549 de cáncer de pulmón en respuesta al tratamiento con diferentes concentraciones de EGCG durante 24 y 48h. Cuando las células inician la muerte celular se desencadena una serie de pasos que culminan con la muerte de la célula. Uno de esos primeros pasos para determinar empieza por cambios morfológicos que se pueden observar por el microscopio. Como se puede ver en el panel a) y b) son células sin tratamiento alguno con medio complementado con una confluencia celular óptima para realizar los experimentos.



Figura 5. Imágenes de la Línea Celular A549. Sin tratamiento con medio complementado, visto desde un microscopio a 20X

Ensayo de viabilidad celular

Este ensayo se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de azul (formazan), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular.

Por lo cual los resultados fueron los siguientes

En una placa de 6 pozos, Se dejó un control y este lo único que tenía era DMEM complementado, dos pozos se dieron tratamiento de EGCG con un stock de 50mM durante 24h, Otros 2 pozos fueron transfectados con el psilencer hdgf durante 48h y por ultimo 2 pozos más tratados con cis-platino con una dosis de 65mM, después de eso se realizó una lectura en el lector de Elisa, estos resultados muestran que efectivamente el EGCG tuvo un efecto sobre la viabilidad celular en la línea a 549 de cáncer de pulmón, por tal motivo se decidió tratar a 24h

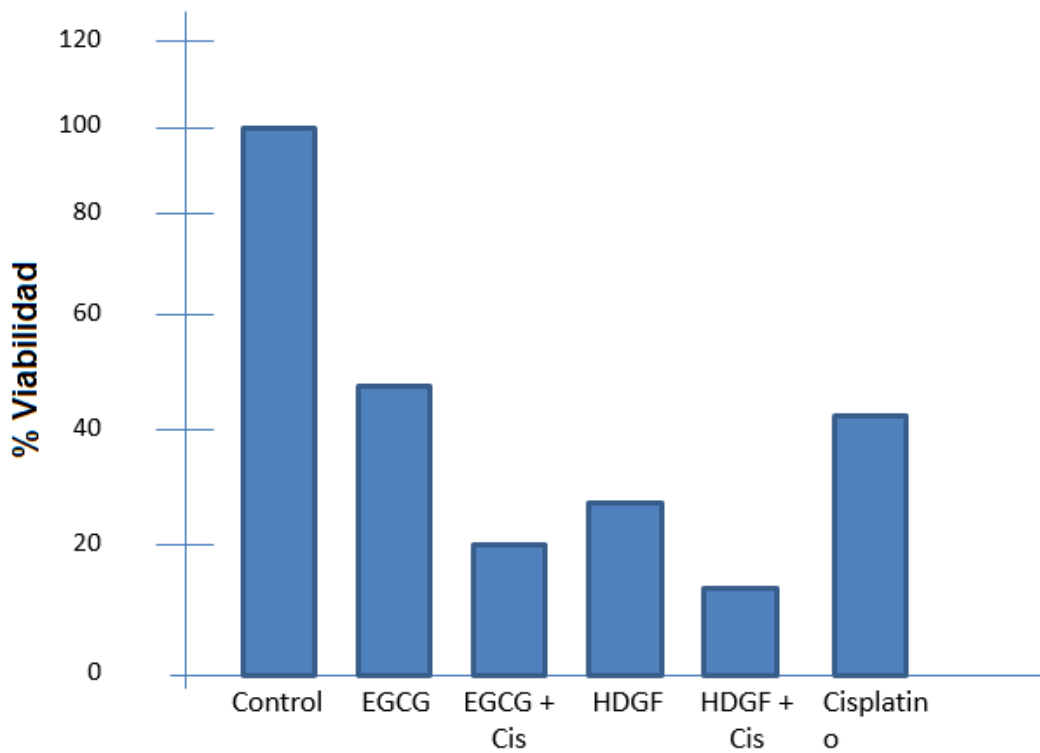


Figura 6 Representación Gráfica de la Viabilidad de células A549 de cáncer de pulmón son diferentes tratamientos. En la primera barra células A549 sin ningún tratamiento, segunda barra tratadas con EGCG, tercer barra tratado con EGCG y con cisplatino, cuarta barra transfectadas en el psilencer hdgf, quinta barra transfectadas en el psilencer hdgf más cisplatino, sexta barra tratado con cisplatino

DL50 de la línea celular A549

Para determinar la viabilidad celular se realizó un ensayo de dosis letal 50 con la finalidad de evaluar cuál es la concentración necesaria para mantener el 50% de las células vivas. Se adicionaron 50,000.00 células en pozos de cultivo con las siguientes concentraciones en milimolar de EGCG. Al control no se le adiciono nada, 20mM, 40mM, 60mM, 80mM, 100mM, 120mM. A todos los pozos se les adicionaron 500µl de medio DMEM sin complementar. Se incubaron durante 24h pasado ese tiempo se adiciono el stock de MTT durante 3h. después se adiciono solvente MTT durante 15 min. Para después llevarlo al lector de Elisa.

Como se muestra a continuación en donde se puede ver la dosis letal 50

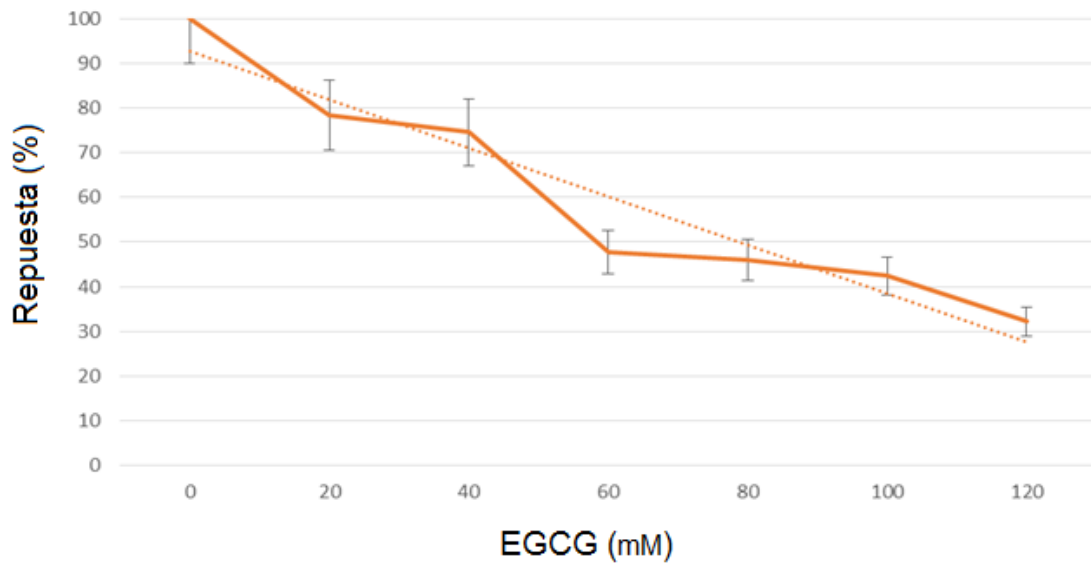


Figura 7. Grafica de porcentaje de viabilidad de células A549 derivadas de cáncer de pulmón tratadas con diferentes concentraciones de té verde (EGCG)

Extracción de proteínas totales de células A549

En la figura se muestra la integridad de los extractos proteicos totales en un gel SDS-PAGE al 10% se trató con EGCG durante 24h. y se utilizó el marcador de peso molecular Dual Color Estándar (Bio-Rad) el cual nos sirve para medir el peso molecular.

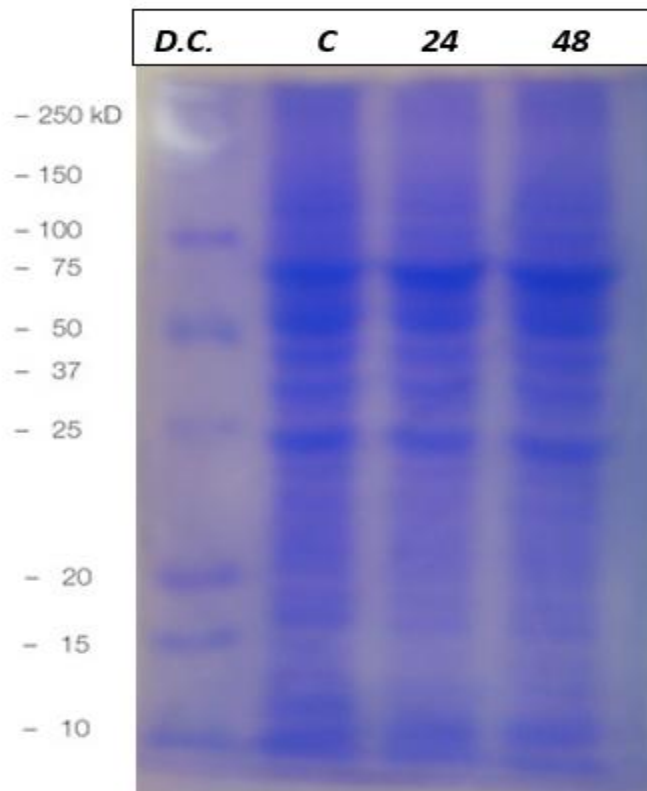


Figura 8 Membrana SDS-PAGE al 10% Carril 1: Dual color Estándar (Bio-Rad) marcador de peso molecular. Carril 2: extractos proteicos de la línea celular A549 sin tratamiento. Carril 3: extractos proteicos de la línea celular A549 con tratamiento de EGCG por 24h. Carril 4: extractos proteicos de la línea celular A549 con tratamiento de EGCG por 48h.

Western Blot de HDGF

Esta técnica nos sirve para determinar si disminuyó la expresión del factor de crecimiento derivado de hepatoma en las células A549 tras recibir un tratamiento de 348 μ M durante 24h. y 48h en comparación con células no tratadas en las cuales están sobre expresada esta proteína. Para esto se cuantificaron las proteínas por ensayo de Bradford y se adiciono 50 μ g de proteína por pozo en un gel de acrilamida al 10 % para realizar una electroforesis y separar las proteínas en función a su peso molecular. El gel fue teñido con azul de coomasie y se llevó al fotodocumentador para observar la presencia de las bandas proteicas.

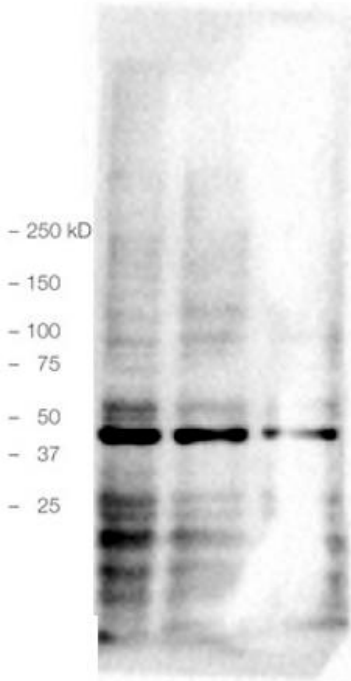


Figura 9 Membrana de SDS-PAGE al 10 %. Carril 1: Dual color Estándar (Bio-Rad) marcador de peso molecular, Carril 2: extractos proteicos de la línea celular A549 sin tratamiento, Carril 3: extractos proteicos de la línea celular A549 con tratamiento de EGCG por 24h, Carril 4: extractos proteicos de la línea celular A549 con tratamiento de EGCG por 48h.

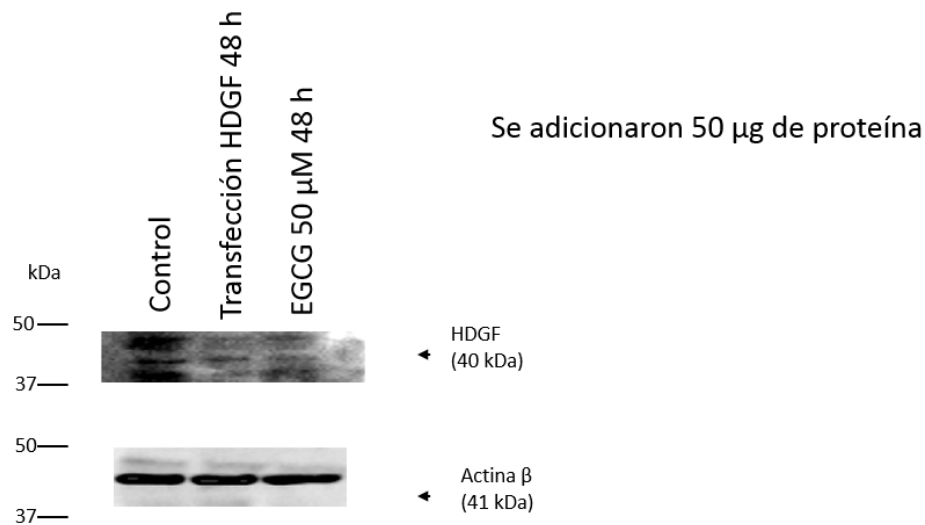


Figura 10 Análisis del silenciamiento de la expresión de HDGF

Western blot de HDGF. En el primer carril se identificó la banda a la cual se hace referencia a la proteína HDGF que es de 40 KDa, en esta se corrieron extractos proteicos sin tratamiento de la línea celular A549. En el carril dos se corrieron extractos proteicos totales obtenidos a partir de células A549 transfectadas con el plásmido psilencer HDGF durante 48h se puede ver una disminución de la detección de la banda correspondiente al HDGF. En el tercer carril se trató con un stock 50μM de EGCG durante 48h se observó una disminución aún más marcada de la banda correspondiente al HDGF. Se utilizó como control de carga la β-actina por lo que se descarta que haya sido el producto de HDGF en ambas bandas.

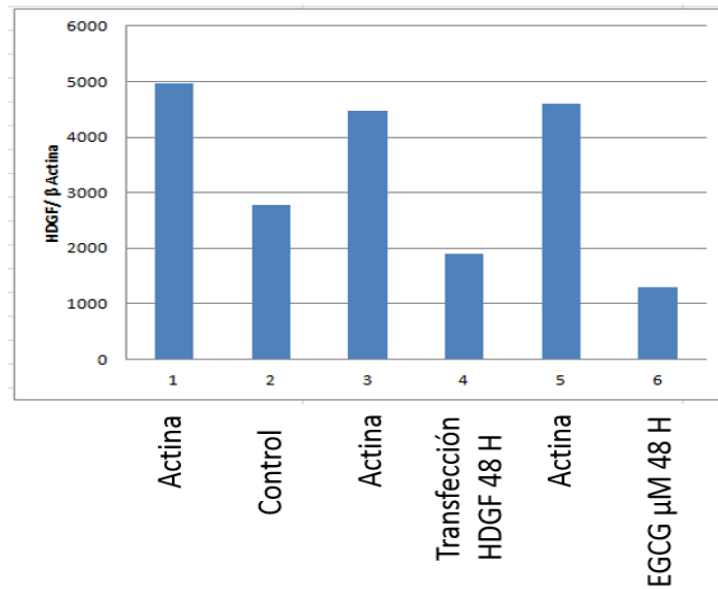
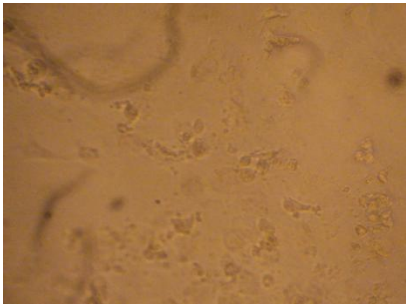


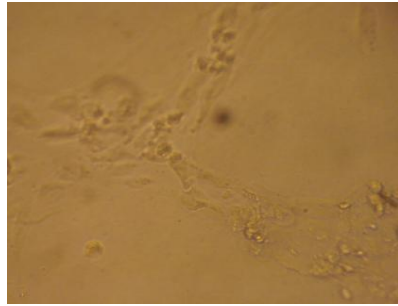
Figura 11 Análisis densitométrico de la expresión del HDGF. La intensidad relativa de la proteína HDGF disminuye en los extractos proteicos de las células A549 transfectadas con el plásmido silenciador HDGF durante 48h, tratadas con un stock de 50μM de EGCG durante 48h, con respecto a la intensidad relativa de los extractos proteicos de las células A549 sin tratamiento.

Ensayo de angiogénesis

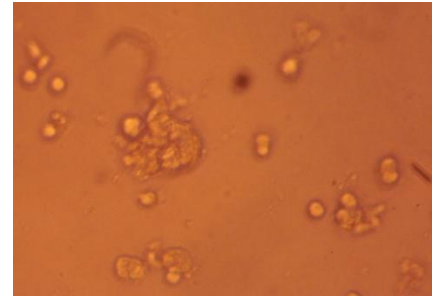
La angiogénesis es un proceso por el cual las células cancerosas crean vasos sanguíneos a partir de vasos sanguíneos que ya existen, por lo cual se realizó este ensayo para determinar si la proteína HDGF induce angiogénesis. Se realizó el experimento con diferentes materiales como son células huvec, que son células endoteliales de humanos, la matrigel y el VEGFA.



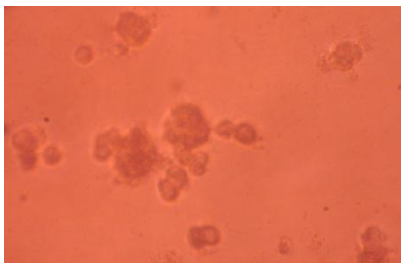
A



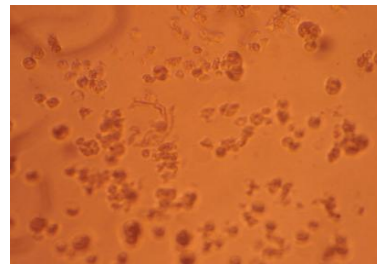
B



C



D



E

Figura 12 Micrografías que muestran la morfología de las células A549 después de los diferentes tratamientos durante 48 h. A) Células HUVEC B) Células HUVEC + control (VEGFA) C) Células A549 sin tratamiento D) Células A549 transfectadas con el plásmido psilencer HDGF. E) Tratadas con EGCG. Fotos tomadas bajo microscopio óptico 20X.

Pudimos observar que en el caso de la línea celular A549 no hay presencia de angiogénesis pues se puede ver que el control positivo que fue las células HUVEC + el control (VEGFA) dan como resultado angiogénesis pues como se puede ver pues hay formación de estructuras complejas por eso podemos decir que en el caso del control si hay presencia, pero ya después cuando se vio la línea celular A549 transfectadas con el plásmido psilencer HDGF se puede ver qué cambio la morfología de las células de ser alargadas y unidas entre sí, solo se pueden ver separadas y granulares, y con una disminución notable. En el caso de las tratadas con EGCG se puede ver que cambia su morfología a pequeñas y con forma granular. En este Ensayo. Se utilizaron el extracto del té verde (EGCG) silenciamiento con el plásmido psilencer HDGF y tratamiento con cisplatino.

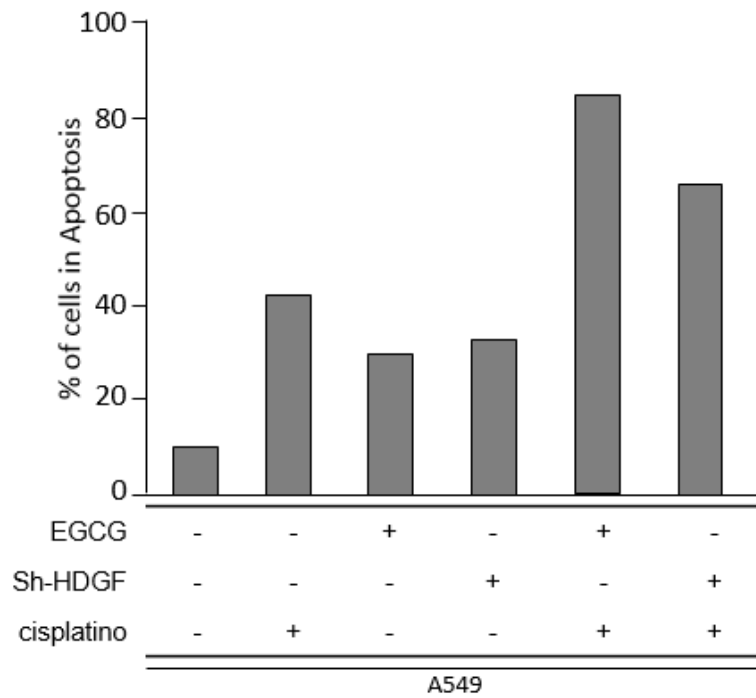


Figura 13 Apoptosis Necrosis. En esta gráfica se puede ver que efectivamente hay presencia de apoptosis necrosis es alta en EGCG con cisplatino.

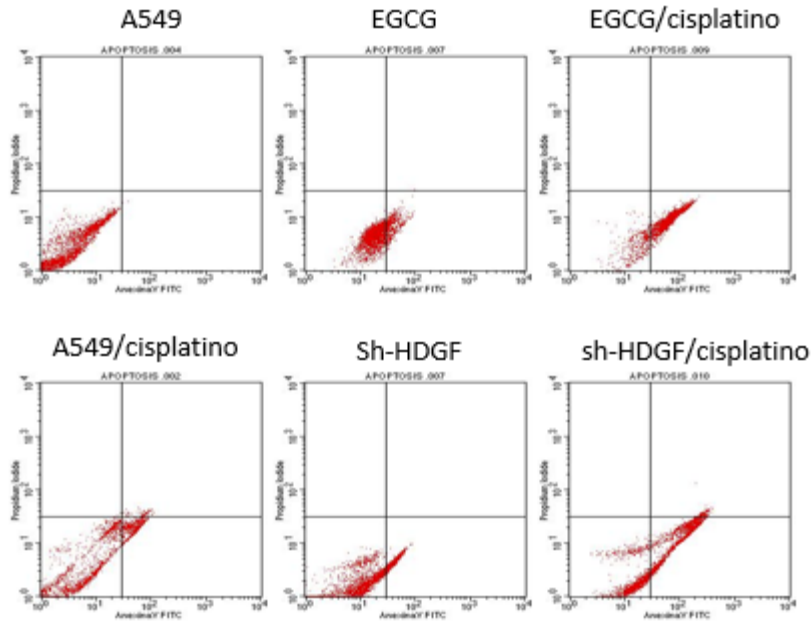


Figura 14 Tabla con los diferentes tratamientos que se realizaron en este ensayo

Wound Healing

Se transfectó con el plásmido psilencer HDGF, además se trató con EGCG lo que se trató de ver en este ensayo fue la migración de las células A549 ya que con la herida que se puso sobre el cubre objetos, lo que se esperaba si las células pueden migrar se cerraría completamente la herida y de esa manera poder corroborar si hay migración. Lo que pudimos ver es que efectivamente la migración de las células en el caso de las células A549 sin tratamiento cerró la herida y con el EGCG se puede ver que si hay disminución del avance de las células y en cuanto a las células silenciadas está herida permaneció casi igual comparada a la inicial

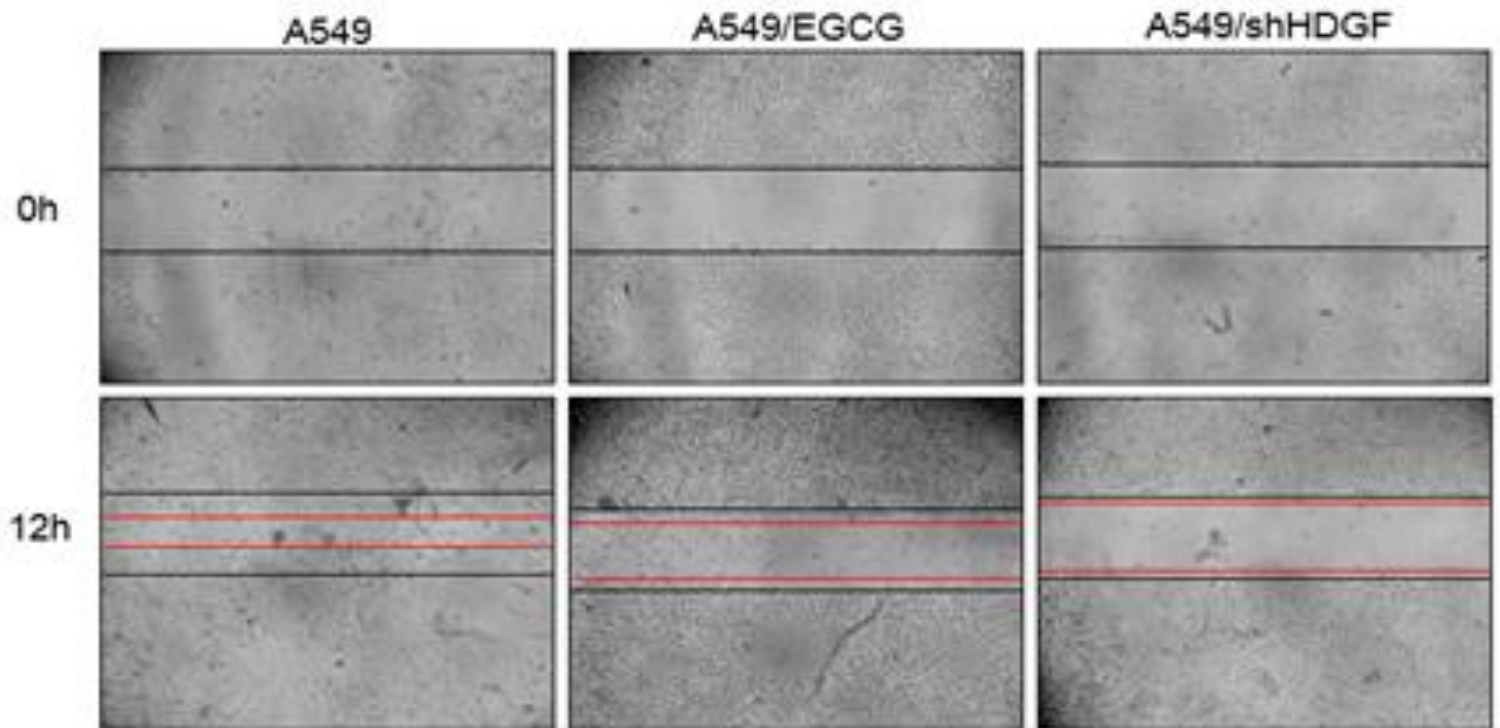


Figura 15 Ensayo de migración. En el primer Carril se puede ver las células A549 sin tratamiento. En el segundo carril se puede ver la línea células. A549 con el tratamiento del EGCG. En el tercer carril se puede ver la línea celular A549 silenciadas con el plásmido psilencer HDGF

7. Conclusiones

1. validar la expresión del factor de crecimiento derivado de hepatocitos (HDGF) en respuesta al tratamiento con EGCG en línea A549 de cáncer de pulmón se validó y fue suprimida la expresión de HDGF.

2. inhibir la expresión del HDGF en las células A549 de cáncer de pulmón mediante el uso de RNA's pequeños interferentes, se inhibió la proteína HDGF al tratarlas con el plásmido 65 mM.

3. Dosis letal 50 se encontró la dosis letal para el tratamiento de la línea celular A 549 de cáncer de pulmón

4. analizar el efecto de la inhibición de la expresión de HDGF en el crecimiento proliferación, migración, e invasión de las células A549 de cáncer de pulmón se llegó a la conclusión que efectivamente que si hay migración, invasión en el cáncer de pulmón de acuerdo con los ensayos de Wound Healing y ensayo de migración.

Bibliografía

1. NCL (2015). http://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/educacion-para-pacientes/WYNTK_pulmon.pdf, revisado en Abril de 2015
2. <http://www.cancer.gov/espanol/tipos/necesita-saber/pulmon/page3> revisado en Abril de 2015
3. <http://www.cancer.gov/espanol/tipos/necesita-saber/pulmon/page4> revisado en Abril de 2015
4. <http://www.iupac.org/> 27 de octubre 2014
5. Tortora G. (2002). Principios de Anatomía y Fisiología. Editorial impresos 2000, México D.F. pp. 793-796 OXFORD .
6. Promocion_de_la_Salud.pdf OMS, 2014
7. Cancer prevention by tea: animal studies, molecular mechanisms and human relevance. *Yang CS, Wang X, Lu G, Picinich SC Nat Rev Cancer. 2009 Jun; 9(6):429-39.*
8. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Higdon JV, Frei B Crit Rev Food Sci Nutr. 2003; 43(1):89-143.*
9. Cancer prevention by tea: animal studies, molecular mechanisms and human relevance. *Yang CS, Wang X, Lu G, Picinich SC Nat Rev Cancer. 2009 Jun; 9(6):429-39.*

10. Thawonsuwan J, Kiron V, Satoh S, Panigrahi A, Verlhac V. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) affects the antioxidant and immune defense of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish physiology and biochemistry*. 2010;36:687–97.
11. Higdon JV, Frei B. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Critical reviews in food science and nutrition*. 2003;43:89–143.
12. Sigler K, Ruch RJ. Enhancement of gap junctional intercellular communication in tumor promoter-treated cells by components of green tea. *Cancer letters*. 1993;69:15–9
13. Mukhtar H, Ahmad N. Tea polyphenols: prevention of cancer and optimizing health. *The American journal of clinical nutrition*. 2000;71:1698S–702S.
14. Ahmed S, Wang N, Lalonde M, Goldberg VM, Haqqi TM. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate (EGCG) differentially inhibits interleukin-1 beta-induced expression of matrix metalloproteinase-1 and -13 in human chondrocytes. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004;308:767–73
15. Khan N, Afaq F, Saleem M, Ahmad N, Mukhtar H. Targeting multiple signaling pathways by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Cancer Res*. 2006;66:2500–5.

16. Yang CS, Lambert JD, Ju J, Lu G, Sang S. Tea and cancer prevention: molecular mechanisms and human relevance. *Toxicology and applied pharmacology*. 2007;224:265–73.